R E P U B L I Q U E F R A N Ç A I S E

INPI
INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIETE INDUSTRIELLE

PCT/FR 99/02949
08 DEC. 1999
09/856702
EJV

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

REC'D 20 DEC 1999
WIPO PCT

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 06 DEC. 1999

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ
PRÉSENTÉ OU TRANSMIS CONFORMÉMENT À LA REGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIETE INDUSTRIELLE
SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersbourg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INPI
INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI

cerfa N° 55 -1328

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES 27.11.98

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL 98 14997

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT 75

DATE DE DÉPÔT 27 NOV. 1998

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

Cabinet ARMENGAUD AINE
3, avenue Bugeaud
75116 PARIS

n°du pouvoir permanent références du correspondant : D.59588 téléphone

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention ☐ demande divisionnaire ☐ certificat d'utilité ☐ transformation d'une demande de brevet européen

demande initiale : ☐ brevet d'invention ☐ certificat d'utilité n° date

Établissement du rapport de recherche ☐ différé ☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance ☐ oui ☒ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

Mutants de la gp120 et leurs applications biologiques

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération (O.R.S.T.O.M.)

Forme juridique

Nationalité (s) Francaise

Adresse (s) complète (s)

13 Rue La Fayette
75480 PARIS CEDEX 10

Pays

FRANCE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs ☐ oui ☒ non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES ☐ requise pour la 1ère fois ☐ requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine	numéro	date de dépôt	nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n° date n° date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (nom et qualité du signataire)

Mandataire : Chantal PEAUCELLE
n° 92-1189

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès du l'INPI.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Mutants de la gp120 et leurs applications biologiques

L'invention vise des mutants de la gp120 et leurs applications.

On sait que les interactions entre le CD4 de cellules cibles et la gp120 de HIV impliquent des régions conservées de la gp120, en particulier un tryptophane (W) en position 427 selon la numérotation des acides aminés de Kwong et al (réf 1 dans la liste bibliographique en fin de description).

Dans l'article de Missé et al (2), dont certains des co-auteurs sont co-inventeurs de la présente demande, il a été démontré qu'une structure stable, dite conservée de la gp120, contenue dans la zone C1, à savoir l'hélice α1 amphipatique, est impliquée dans les interactions avec le récepteur CD4. De plus la construction d'une gp120 sans l'hélice α-1 a permis de démontrer qu'une interaction est toujours possible avec la cellule cible, en particulier avec le récepteur CXCR4, récepteur aux chimiokines sur les lymphocytes.

En induisant des mutations ponctuelles dans les structures conservées de la gp120, et plus spécialement de l'hélice α1 et de l'hélice α2, les inventeurs ont mis en évidence le rôle important joué par ces structures

dans les interactions avec les cellules cibles.

L'invention vise donc des mutants de la gp120, caractérisés en ce qu'ils comportent au moins une mutation dans une région riche en acides aminés aromatiques de l'hélice α1 et/ou de l'hélice α2 de la gp120.

Des mutants selon l'invention comprennent au moins une mutation, cette mutation étant située dans la région de la gp120 correspondant à la cavité d'interaction avec le CD4.

L'invention vise plus spécialement les mutants de la gp120 dans lesquels W en position 112 est remplacé par un acide aminé non aromatique tel qu'une sérine S.

Une telle mutation induit une absence totale de fusion cellulaire. Les tests de fusion cellulaire, qui sont rapportés ci-après dans la partie exemple, montrent ainsi que la substitution W112S abolit la formation de *syncytia* entre des cellules HeLa-Tat (exprimant une gp160 contenant cette mutation) et des cellules HeLa P4. De plus, un virus contenant cette même mutation est incapable d'infecter des lymphocytes humains. Une substitution de ce même W (résidu aromatique bicycle) par un résidu aromatique (monocyclique) diminue ces fonctions mais ne les supprime pas.

De plus, chez de tels mutants, la reconnaissance par des anticorps spécifiques du site de

liaison à CD4 défini par Cordonnier et al (3) est fortement diminuée.

Ces résultats montrent donc le rôle capital de la structure conservée de l'hélice α1 pour la fixation au CD4.

En plus de la mutation en position 112, de tels mutants peuvent également comporter une mutation de F en position 383 en alanine et/ou du tryptophane en position 427 remplacé par une glycine et/ou du tryptophane en position 479 remplacé par une sérine.

Les données cristallographiques publiées dans (1) ont permis de visualiser d'une part la position de l'hélice alpha 1 de la gp120 dans cette structure tridimensionnelle et d'autre part des résidus tryptophane.

Ces données ont confirmé les résultats des expériences biologiques évoquées ci-dessus.

En particulier, le W 112 se trouve dans la poche hydrophobe décrite comme poche d'interaction de la gp120 au CD4 ; cette poche est constituée d'un "cluster" de résidus aromatiques, qui interagirait avec un autre résidu aromatique la F43 du CD4. En outre, il ressort de cette étude que les résidus tryptophane ont une position stratégique dans cette poche. Ainsi toute mutation de l'un d'entre eux déstabiliserait cette "cavité" et empêcherait toute liaison avec la F43 du CD4.

D'autres mutants selon l'invention, comprennent, le cas échéant en plus des susdites mutations dans la structure de l'hélice α1, au moins une mutation, qui est située dans la région de la gp120 correspondant à la structure de l'hélice α2, en aval de la boule V3 de la gp120.

L'invention vise tout spécialement le mutant dans lequel W en position 338 est remplacé par une sérine.

Cette mutation unique est capable d'induire une absence totale de fusion cellulaire lorsqu'on met en présence des cellules cibles $CD4^+$, $CXCR4^+$ et des cellules qui expriment la gp120 mutée W338S.

Le virus complémenté par une enveloppe comportant la mutation W338S au niveau de la gp120 n'est plus capable d'infecter les cellules (voir figure 3).

Comme noté plus haut, W faisant partie de la structure α2 conservée, cet acide aminé se trouve donc dans la deuxième poche contenant des résidus aromatiques et des résidus hydrophobes.

Cette mutation suggère alors que cette structure est impliquée dans l'interaction avec les co-récepteurs, par exemple CXCR4, compte tenu des résultats biologiques.

Les mutants selon l'invention, en permettant d'étudier le rôle des structures conservées constituent

une nouvelle façon d'aborder les interactions agents infectieux-cellules cibles. Le fait de mieux appréhender la fonctionnalité des différentes structures conservées impliquées dans les interactions agents pathogènes-cellules cibles permet en effet la conception de molécules thérapeutiques ou immunisantes contre le VIH.

L'invention, mettant à profit la mise en évidence de ces poches d'interaction, vise des composés capables de mimer le CD4, et dotés ainsi de propriétés inhibitrices vis-à vis de la gp120.

Elle vise également des peptides mimant les boucles extracellalaires des co-récepteurs, capables de se loger dans lesdites poches hydrophobes.

L'invention concerne également des peptides capables de mimer les régions constantes de la gp120 évoquées ci-dessus, et susceptibles de constituer des candidats comme vaccins. L'invention fournit ainsi des modèles pour l'élaboration de tels candidats.

En outre, en effectuant des mutations sur la première cavité, il est possible d'induire des transformations de la gp120 permettant une meilleure exposition de la deuxième cavité, et par là de la gp120 en tant qu'antigène. De manière avantageuse, on obtient alors une réponse immune adaptée contre ces régions constantes habituellement cachées.

Par de telles transformations, il est également possible d'induire des dissociations entre la gp120 et la gp41. Comme montré dans les exemples donnés ci-après, on n'observe aucune fusion lorsqu'on utilise des virus complémentés par une gp160 comportant une mutation au niveau de la gp120, alors que la glycoprotéine responsable de la fusion est la GP41. La mutation sur la gp120 constitue donc une cible pour empêcher la fusion du virus. On dispose ainsi d' épitopes clés pour éviter l'infection par HIV.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention sont donnés dans les exemples qui suivent, dans lequels il et fait référence aux figures 1 et 2.

La figure 1 représente les résultats de tests d'infectivité de pseudovirus HIV-1 complémentés par une enveloppe comportant des mutations selon l'invention au niveau de la gp120 et la figure 2, la structure cristalline de la gp120.

Exemple : obtention et étude de mutants de la gp120

Ces mutants de gp120 ont été testés dans plusieurs systèmes biologiques :

(i) la fusion cellulaire (enveloppes mutées à la surface des cellules), (ii) les infections virales (pseudo-virus complémentés par des gp120 mutées), (iii) l'analyse de la topologie de ces gp120 mutées faite par différents anticorps monoclonaux reconnaissant différents

épitopes de la gp120 dans le "CD4 binding site", et (iv) l'analyse de la gp120 à travers les données cristallographiques.

Ces expériences ont été réalisées en utilisant les matériels méthodes suivants :

. Plasmides, anticorps et pseudovirus

Le plasmide pHXB2ENV (code pour l'enveloppe gp160 du VIH-IIIB), le plasmide pCMV-rev (code pour la protéine Rev sous le contrôle du promoteur CMV), et l'anticorps monoclonal 902 (dirigé contre la boucle V3 de la gp120), ont été obtenus du NIH AIDS Research and Reference Reagent Program (EU). Le pseudovirus pNL4-3env-GFP a été fourni par le Dana-Farber Cancer Institute, Boston, EU. Ce plasmide contient le génome du VIH-1 NL4-3 délété du gène Env, ainsi qu'une substitution du gène Nef par le gène codant pour la protéine GFP (Green Fluorescent Protein).

. Mutagénèse dirigée dans l'hélice alpha 1 de la gp120

Dans le but d'étudier les résidus W présents dans la structure hélice alpha 1 de la gp120, la région NdeI-HincII du gène codant pour la gp120 a été reconstitué. A cet effet on a utilisé un oligonucléotide

dans lequel ont été introduits deux sites de restriction (HpaI et HindIII) entourant l'hélice alpha 1 (2). L'hélice alpha 1 de la gp120 possède deux résidus tryptophane (W96 et W112) (4). Les sites HpaI et Hind III ont permis d'échanger pour chaque construction un fragment HPaI-Hind III sauvage par un fragment HpaI-Hind III muté. Les mutations ont été effectuées soit simultanément sur les deux W, soit sur un seul tryptophane. La mutagénèse dirigée a été effectuée par la méthode des oligonucléotides chevauchants compris entre le site Hpal et Hind III du plasmide pBS. Dans le tableau 1 ci-dessous ne figurent que les oligonucléotides qui comportent la mutation souhaitée.

Tableau 1

Mutants	Oligonucléotides
96W/S	5' AAC GTG ACA GAA AAT TTT AAC ATG AGT AAA AAT G 3'
112W/S	5' GAT ATA ATC AGT TTA TCT GAT CAA AGC 3'
96W/I	5' AAC GTG ACA GAA AAT TTT AAC ATG ATC AAA AAT G 3'
112W/I	5' GAT ATA ATC AGT TTA ATC GAT CAA AGC 3'
96W	5' AAC GTG ACA GAA AAT TTT AAC ATG TGG AAA AAT G 3'
112W	5' GAT ATA ATC AGT TTA TGG GAT CAA AGC 3'

. Fusion cellule-cellule

Les vecteurs d'expression contenant les différentes enveloppes gp160 (pHXB2ENV, 500ng) ont été

co-transfectés avec 500 ng de pCMV-rev dans des cellules HeLa-Tat. La méthode de transfection utilisée a été la lipofection (lipofectamine, GIBCO) comme décrit dans (2).

Le pCMV-rev est indispensable pour activer l'expression du gène ENV présent dans le plasmide pHXB2 ENV. Les cellules transfectées ont ensuite été mises en coculture avec les cellules HeLaP4 (CD4-LTR LacZ) comme décrit sans (2).

. Expression à la surface cellulaire des gp120 mutées

La technique de transfection utilisée a été la même que celle employée dans le cas de la fusion cellule-cellule.

Vingt-quatre heures avant la co-transfection, les cellules HeLa-Tat ont été placées dans des puits de 3,5 cm de diamètre recouverts de lamelles de verre (12 mm de diamètre). Les cellules ont été incubées 48 heures après la co-transfection avec l'Acm 902 (dirigé contre la boucle V3 de la gp120) à la concentration de 10 µg/ml. Cette incubation a été réalisée en présence de 0,1 % d'azide de sodium (NaN_3) et en tampon PBS. Après 2 lavages en PBS 0,3 % BSA /0,1 NaN_3, les cellules ont ensuite été incubées avec un anticorps anti-IgG de souris marqué au Texas-red (Molecular probes). Après 3 lavages extensifs, les cellules ont été fixées pendant 2 minutes

avec un mélange éthanol-acétone (1:2). Après montage des lamelles sur des lames avec du Mowiol, les cellules ont été observées en microscopie confocale.

. Dosage de la p24 par ELFA (Enzyme linked fluorescent assay)

Le dosage de la p24 est effectué avec le système automatisé VIDAS HIV DUO (BioMérieux). Ce test repose sur une détection simultanée de l'antigénémie p24 et des anticorps anti-VIH-1 et anti-VIH-2. Le principe du test associe deux réactions immuno-enzymatiques à une détection en fluorescence. Ce test est muni d'un cône à usage unique qui sert à la fois de phase solide et de système de pipetage. Dans la partie basse du cône, sont fixés trois peptides de ssynthèse (gp41, gp36 et un peptide spoécifique du type O) conjugués à des Acms de souris anti-IgG humaines marqués à la phosphatase alcaline. Dans la partie haute du cône, sont fixés des Acms anti-p24. Lors de la réalisation du test, un anticorps de lapin anti-p24 biotinylé (conjugué à la streptavidine-phosphatase alcaline) est ajouté en même temps que l'échantillon. Le substrat, 4-méthyl-ombelliferyl-phosphate, permet de mesurer la fluorescence qui est proportionnelle à la quantité d'Ac anti-HIV et/ou d'Ag p24 présents dans l'échantillon. La réaction est réalisée en 90 minutes et une lecture de la fluorescence est faite avec le lecteur spécifique du test VIDAS (longueur d'onde de 450 nm).

Infections des lymphocytes humains par des pseudo-virus mutés obtenus par complémentation.

Des cellules 293 ont été co-transfectées avec 10 µg de pseudovirus pNL4-3 GFP, 2 µg du plasmide pHXB2ENV (contenant ou non les différentes mutations dans la SUgp120) et 1,5 µg du plasmide pCMV-rev. Pour cela, la méthode de transfection au phosphate de calcium a été utilisée. Quarante-huit heures après la transfection, les surnageants des cellules ont été prélevés, filtrés et conservés à -80°C jusqu'à l'utilisation. Une mesure de la p24 a ensuite été effectuée sur ces différents surnageants. Des lymphocytes humains stimulés prélablement pendant 3 jours par 10 µg/ml de PHA (Phytohémaglutinine), 50 U d'IL-2 dans un milieu de culture RPMI 1640-10 % SVF (Sérum de Veau Foetal), ont été incubés avec les différents surnageants de cellules 293 transfectées (contenant une concentration identique de p24).

Les capacités infectieuses des différents surnageants ont été visualisées par microscopie à fluorescence (expression de la protéine GFP dans les lymphocytes) et déterminées par un dosage de la p24 (suivi périodique tous les 3 jours) dans les surnageants de culture de lymphocytes infectés.

. Analyses Structurales

La structure du complexe constituée par le coeur de la gp120, les deux premiers domaines du CD4 et le fragment Fab de l'anticorps neutralisant 17b a été récemment déterminée par cristallographie aux rayons X (1). Cette structure a été déposée dans protéine data base (pdb) sous le code d'accès "Igcl". Les coordonnées structurales de ce complexe ont été analysées avec le logiciel Insight I (MSI pour Molecular Simulations) sur la station graphique Oxygène (Silicon grafic O_2). La visualisation et la modélisation des domaines de la gp120 et du CD4 ont été effectués à l'aide du programme Discover (MSI) sous l'environnnement Insigth II.

. Résultats

. Capacités fusiogènes des enveloppes gp160

Afin d'évaluer les capacités fusiogènes des différentes enveloppes gp160 exprimées à la surface des cellules HeLa-Tat transfectées, ces cellules ont été mises en co-culture avec des cellules HeLa P4 (CD4 LTR *LacZ*).

Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 2 suivant

Tableau 2

Mutations dans la gp120	Pourcentage de foyers de fusion
Type sauvage	100 % (environ 1500 foyers de fusion/puit)
96W/S et 112W/S	0 %
96W/I et 112W/I	0 %
96W/F et 112W/F	60 %
96W/F	100 %
112W/F	60 %
96W/S	Non déterminé
112W/S	0 %
427W/S	0 %
338W/S	0%
Contrôle	0 %

On constate à l'examen de ces résultats que des mutations simultanées sur les deux résidus tryptophane de l'hélice alpha 1 (W96 et W112) en sérine ou en isoleucine rendent l'enveloppe gp 160 incapable d'induire des *syncytia* entre les cellules. Le même phénomène est observé avec l'enveloppe gp 160 contenant la mutation ponctuelle 112 W/S et/ou 338 W/S. En revanche, la substitution d'un résidu tryptophane (W) par un résidu aromatique phénylalanine (F), d'indice hydrophobicité proche, réduit d'environ 50 % les capacités fusiogènes des enveloppes mutées. On peut constater que, quelle que soit la construction, ce phénomène est observé uniquement lorsque le résidu W112 et/ou le résidu W338 est (sont) impliqué(s), ce qui dénote l'importance biologique de ce ou ces résidus, par rapport au groupement W96 (dans le cadre de ces expériences). Tous ces résultats ont été comparés avec ceux obtenus avec l'enveloppe gp160 sauvage

(dans laquelle onobserve environ 1500 foyers de fusion). Le contrôle négatif était la mise en co-culture de cellules HeLa-Tat non transfectées avec des cellules HeLa P4 (aucun foyer de fusion n'a été observé).

Ces résultats indiquent que le résidu W112 et/ou le résidu W338 est (sont) impliqué(s) dans les interactions gp120-cellules cibles, qui précèdent le phénomène de fusion cellulaire.

. Expression à la surface cellulaire des protéines gp120

La gp120 a été détectée par l'Acm 902, dirigé contre la boucle V3 de la gp120. Ce dernier a ensuite été révélé par un anti-IgG de souris couplé au Texas red. On constate qu'aussi bien la gp120 sauvage que la gp120 112W/S, sont exprimées à la surface des cellules. L'incubation de l'anticorps 902 avec des cellules HeLa-Tat non transfectées ne donne aucun signal.

. Capacités infectieuses des peudo-virus complémentés

La figure 1 montre l'évolution du taux de p24 dans les surnageants de lymphocytes (préalablement activées par 10 µg/ml de PHA et 50 U / ml d'IL2) mis en contact avec :

- le pseudovirus complémenté par la gp120 de type sauvage (courbe - ● -)

- le pseudovirus complémenté par la gp120 mutée (gp120 112W/S) (- ○ -)

- le pseudovirus complémenté par la gp120 mutée (gp120 338W/S) (- ■ -)

Dans le premier cas, le taux de p24 diminue d'abord pour augmenter considérablement (à partir du 10ème jour après l'infection), ce qui prouve la présence d'une p24 synthétisée *de novo*, produit d'une infection virale.

Dans le deuxième cas, le taux de p24 diminue progressivement pour disparaître complètement au 20ème jour (après la mise en contact). Il n'y a donc pas eu infection des cellules grâce à la mutation 112 W/S dans la gp120. Ce fait a été confirmé par l'absence d'expression de la protéine GFP dans les cellules incubées avec le virus muté 112 W/S et/ou 338 W/S (visualisation en microscopie à fluorescence).

L'absence d'infection des cellules observée dans ce dernier cas, peut-être expliqué par l'absence de formation de *syncytia* visualisée précédemment avec des cellules exprimant à leur surface la gp120 112 W/S et/ou la gp120 338 W/S.

. Analyse tridimensionnelle et localisation structurale des mutations effectuées.

La structure cristallographique du complexe gp120-CD4-17b Fab a récemment été déterminée (3) avec une résolution de 2,5 Å (Figure 2).

Les coordonnées de cette structure ont été analysées à l'aide du logiciel Insight II, permettant de situer les acides aminés dans un contexte tridimensionnel beaucoup plus résolutif que les modèles prédictifs qui ont été à l'origine de notre démarche.

L'analyse de la structure cristallographique du complexe gp120-CD4 met en éviddence un nombre de résidus réduits formant l'interface entre les deux protéines. L'interaction majoritaire entre la gp120 et le CD4 est localisée au niveau d'une poche hydrophobe, impliquant l'acide aminé W427 de la gp120 et le résidu F43 du CD4 (Wyatt et Coll., 1998).

De plus, comme le montre la Figure 3, le W112 est stratégiquement localisé dans cette cavité riche en résidus aromatiques et interagit directement avec la F43 du CD4. Le résidu F43 se logerait au milieu de cette poche et interagirait directement avec W112. L'interaction du W112 avec la F43 et le W427 permettrait

de stabiliser l'ensemble de la poche hydrophobe. On peut noter que le W112 et le W427 sont situés à une distance inférieure ou égale à 5Å l'un de l'autre, ce qui nous indique que ces deux résidus tryptophane sont susceptibles d'interagir fortement.

Cette interaction pourrait être réalisée par effet d'empilement des noyaux aromatiques entre ces deux résidus ou par liaison dipôle-dipôle. De plus, ces distances peuvent s'avérer en réalité être beaucoup plus réduites en tenant compte de l'aspect dynamique des interactions moléculaire *in vivo*.

L'analyse cristalline a permis en outre de découvrir que W 338 de l'hélice α2 est susceptible de jouer un rôle majeur dans la stabilité de la deuxième cavité (sur un total de 2 cavités incluses à l'intérieur de la gp120), constituée des résidus hydrophobes et aromatiques. Dans ces conditions, cette cavité peut être considérée comme capitale dans les interactions avec la gp120 et les co-récepteurs, par exemple CXCR4.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Kwong PD., Wyatt R., Robinson J., Sweet R W., Sodroski J. and Hendrickson W A. 1998. Structure of an HIV gp120 enveloppe glycoprotein in complex with the CD4 receptor and neutralizing antibody. Nature. 393:648.

2. Missé D., Cerruti M., Schmidt I., Jansen A., Devauchelle G., Jansen F. and Véas F. 1998. Dissociation of the CD4 and CXCR4 binding properties of human immunodeficiency virus type 1 gp120 by deletion of the first putative alpha-helical conserved structure. J. Virol 72:7280.

3. Cordonnier A., Montagnier L., and Emmerman M. 1989. Single amino-acid changes in HIV envelope affect viral tropism and receptor binding. Nature 340:571.

4. Hansen J E., Lund O., Nielsen JO., Brunak S. and Hansen JES. 1996. Prediction of the secondary structure of HIV-1 gp 120. Proteins 25:1.

REVENDICATIONS

1/ Mutants de la gp120, caractérisés en ce qu'ils comportent au moins une mutation dans une région riche en acides aminés aromatiques de l'hélice α1 et/ou de l'hélice α2 de la gp120.

2/ Mutants selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'ils comprennent au moins une mutation, cette mutation étant située dans la région de la gp120 correspondant à la cavité d'interaction avec le CD4.

3/ Mutants selon la revendication 2 dans lequels W en position 112 est remplacé par un acide aminé non aromatique, tel qu'une sérine.

4/ Mutants selon l'une quelconque des revendications 2 ou 3, caractérisés en ce qu'ils comportent en outre une mutation de F en position 383 en alanine, et/ou du trytophane en position 427 en glycine, et/ou du tryptophane en position 479 en sérine.

5/ Mutants selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'ils comprennent au moins une mutation qui est située dans la région de la gp120

correspondant à la struture de l'hélice α2, en aval de la boucle V3 de la gp120.

6/ Mutants selon la revendication 5, caractérisés en ce que W en position 338 est remplacée par une sérine.

Figure 1

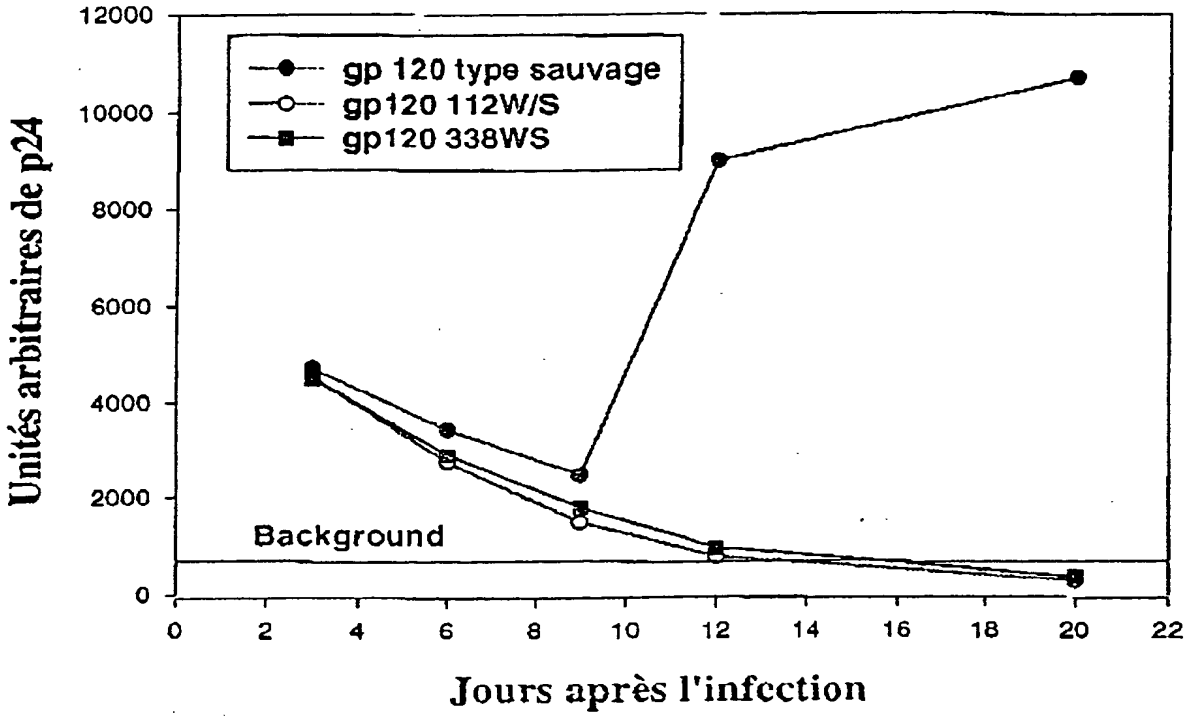

12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
gp 120 type sauvage
gp120 112W/S
gp120 338WS
Background
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
Unités arbitraires de p24
Jours après l'infcction

Figure 2



THIS PAGE BLANK (USPTO)